УДК 619:579.887.111:616-073

И.А. Рунина, О.А. Чупина, М.И. Сорокина, Д.Б. Андрейчук, А.В. Спрыгин, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, В.Н. Ирза

ОЦЕНКА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАХЕАЛЬНЫХ ОРГАННЫХ КУЛЬТУР

Введение

Mycoplasma gallisepticum (*M. gallisepticum*) является возбудителем респираторного микоплазмоза птиц – высококонтагиозного заболевания кур и индеек [4]. В настоящее время микоплазмозы имеют широкое географическое распространение на территории Российской Федерации [1]. Так в 2006 году *M. gallisepticum* была выявлена в 138 птицеводческих хозяйствах из 200 исследованных.

В сложившейся ситуации идентификация возбудителя, его изоляция и изучение иммунобиологических свойств выделенных изолятов являются необходимым условием разработки комплексных мероприятий по контролю заболевания.

Для оценки патогенности вирусов с эпителиальным тропизмом широко используют трахеальные органные культуры (ТОК).

Цель настоящей работы: показать возможность применения трахеальных органных культур для оценки степени патогенности изолятов микоплазм [3, 5].

Материалы и методы

Питательные среды. В работе использовали модифицированную среду Фрея, среду Игла, среду 199 и среду ПСП. Отсутствие контаминации посторонней микрофлорой проверяли посевом на МПА, МПБ, ТСБ и среду Сабуро.

Микоплазмы. Для исследования использовали референтные штаммы *M. gallisepticum* «S6» и «R», а также изоляты, выделенные из патологического материала птицехозяйств Российской Федерации: изолят «Магнитогорский» (Челябинская область), изолят «Красный Колос» (Липецкая область), изолят «Красносулимский» (Ростовская область).

Лабораторные животные. В работе использовали 19–21-суточные СПФ куриные эмбрионы фирмы «Lohman Tierzucht» (Германия) и неиммунных цыплят в возрасте 1–42 суток.

Трахеальные органные культуры (ТОК). ТОК готовили и поддерживали в жизнеспособном состоянии согласно методике [2] с некоторыми модификациями.

Титрование *M. gallisepticum* в трахеальной органной культуре. Проводили титрование культур *M. gallisepticum* в ТОК, приготовленной из СПФ эмбрионов кур сроком инкубации 21 сутки. Титрование образцов проводили с десятикратным шагом. В свежеприготовленные ТОК с объемом поддерживающей среды 0,9 мл вносили по 0,1 мл суспензии каждого из разведений не менее чем в 4-х повторностях. В качестве контроля использовали не менее 5 образцов незараженных ТОК.

В качестве поддерживающей среды использовали среду ПСП без сыворотки. Специфическим действием *M. gallisepticum,* по которому учитывали наличие в культуре патогенного микроорганизма, считали полный цилиостаз в кольце трахеи. Цилиостаз в ТОК, наступивший ранее 48 часов после заражения, считали неспецифическим.

Определение патогенности полевых изолятов *M. gallisepticum* для восприимчивых животных. По 10 неиммунных цыплят в возрасте 10-20 суток заражали культуральной суспензией изолятов «Магнитогорский», «Красносулимский», «Красный колос» и штамма «R» в дозе 250 CD_{50}/0,5мл. Из общего объема заражающего материала 2 капли вносили на конъюнктиву глаз, 2 капли – интраназально, а оставшуюся часть выпаивали. Клинические наблюдения за зараженными животными проводили в течение 20 суток. Через 7 и 14 суток по 2 птицы из каждой группы убивали, исследовали внутренние органы, определяли цилиарную активность (ЦА) под световым микроскопом (увеличение x100). Для каждой группы определяли среднюю ЦА трахеи в баллах согласно методике [2]. Заболевшими считали цыплят, средняя ЦА трахеи которых составляла менее 2 баллов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР проводили по стандартной методике [6].

Результаты и обсуждение

Подбор оптимальных условий проведения опытов по изучению биологических

Таблица 1

Титр инфекционной активности изолятов M. gallisepticum, определенный разными методами (n=3)

M. gallisepticum	Цилиостатическая доза (CD_{50}/мл)	Количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл)
Изолят «Магнитогорский»	6,83±0,72	6,0±0,3
Изолят «Красный колос»	4,55±1,21	5,0±0,7
Изолят «Красносулимский»	4,20±0,33	4,0±0,9
Штамм «S6»	6,36±1,0,9	7,0±0,4

свойств изолятов микоплазм на трахеальных органных культурах. При оценке различных сред для поддержания ТОК, среда Игла, среда 199 и среда ПСП. В последней была отмечена лучшая жизнеспособность эпителиальной ткани. Однако при внесении в выбранную среду до 50% среды Фрея, необходимой для роста *M. gallisepticum*, снижения цилиарной активности ТОК не наблюдалось. В свою очередь, безвредность ПСП для микоплазм была подтверждена реизоляцией возбудителя из ТОК на 6-е сутки после заражения и однократной смены среды.

Для определения влияния возраста птицы на жизнеспособность эпителиальной ткани проводили сравнение образцов, приготовленных из трахей 19-20-суточных СПФ-эмбрионов и из трахей 1,- 14,- 28,- 42-суточных кур. Полученные результаты показали возможность использования для приготовления ТОК птиц всех вышеперечисленных возрастов.

Максимальное время жизнеспособности ТОК без потери цилиарной активности составило 6 суток для всех исследованных образцов (с обязательной сменой среды на третий день в препаратах ТОК, приготовленных из трахей 14-42-суточных птиц).

Для оценки чувствительности ТОК к микоплазмам проводили титрование производственного штамма «S6» *M. gallisepticum* в ТОК, приготовленной из СПФ эмбрионов кур сроком инкубации 21 сутки. В качестве поддерживающей среды использовали среду ПСП без сыворотки. В данных условиях развитие *M. gallisepticum* вынужденно проходит в ассоциации с живыми клетками эксплантатов трахеи, что вызывало поражение цилиарного эпителия и выражалось в потере им цилиарной активности (ЦА). Действием *M. gallisepticum*, по которому учитывали наличие в культуре организма, считали полный цилиостаз в кольце трахеи.

Через 24-48 ч после заражения в ТОК отмечали набухание тканей, децилиацию эпителия и его десквамацию. Явления дистрофии и некроза в тканях становились более выраженными, отмечали глубокие поражения подслизистого слоя, большое количество клеточного дебриса. Цилиостаз в зараженных ТОК наступал не ранее 72 ч, и гибель зараженных культур наблюдалась в течение 5 суток после инфицирования. В контрольной группе снижения цилиарной активности ТОК не наблюдалось в течение 6 суток (период наблюдения).

Сравнительная оценка значений титров полевых изолятов и штамма «*S6*» *M. gallisepticum*, определенных разными методами. Исследовали активность штамма «S6», *M. gallisepticum,* используемого для производства вакцин, и полевых изолятов микоплазм. Проводили параллельное титрование возбудителей на твердых питательных средах и в ТОК. Цилиарную активность наблюдали ежедневно в течение 5 суток. Титр инфекционной активности исследованных образцов был рассчитан в дозах, вызывающих цитолиз в половине зараженных культур (CD_{50}) и в колониеобразующих единицах (КОЕ) (табл. 1).

Поскольку титры, рассчитанные в CD_{50} и в КОЕ, сопоставимы, можно говорить о высокой чувствительности ТОК к *M. gallisepticum*. Оценивая результаты проведенных исследований, можно сделать заключение, что изолят «Магнитогорский» показал наибольшую активность, сопоставимую с штаммом «S6» *M. gallisepticum*.

Результаты определения патогенности полевых изолятов *M. gallisepticum* для восприимчивых животных. Клинические наблюдения за зараженными животными проводили в течение 20 суток. Через 7 и 14 суток по 2 птицы из каждой группы убивали, исследовали внутренние органы, определяли цилиарную активность трахеи.

После заражения выбранными изолятами *M. gallisepticum* у птиц всех групп на 5-7 сутки наблюдали конъюнктивиты, легкие респираторные расстройства (серозные риниты, трахеальные хрипы). При вскрытии птиц через 14 суток после заражения изолятами «Магнитогорский», «Красносулимский», «Красный колос» отмечали трахеиты. У птиц, зараженных штаммом «R», выявляли синуситы, аэросаккулиты, оча-

Таблица 2

Средняя цилиарная активность трахеи цыплят, зараженных изолятами *M. gallisepticum* (n=3)

Изоляты *M. gallisepticum*	Средняя цилиарная активность эпителия трахеи	
	7 сут после заражения	14 сут после заражения
«Магнитогорский»	1,8±0,44	2,11±0,44
«Красный колос»	2,1±0,44	3,0±0,33
«Красносулимский»	1,7±0,33	3,66±0,44
Штамм «R»	0	0,33±0,44
Контроль	3,8±0,33	3,78±0,35

говую пневмонию.

Цилиарная активность эпителия трахеи птиц, зараженных вариантами *M.gallisepticum*, представлена в табл. 2.

Таким образом, через 14 суток после заражения изолятами «Красносулимский», «Магнитогорский» и «Красный колос», отмечалось восстановление эпителия трахеи. Штамм «R» обладал большей патогенностью для цыплят, и после 14 суток цилиарная активность трахеи не восстанавливалась.

Был проведен ПЦР-анализ изолятов с системами праймеров на ген GapA (праймеры предложены M.S.Goh et al., 1998) с последующим секвенированием полученных GapA-ампликонов. Секвенирование фрагмента гена GapA (332 п.н.) проводили с использованием внутренних праймеров GapA 3F и GapA 4R (Goh M.S. et al., 1998), а также радиоактивно-меченного alpa-32P-dATP. В результате были получены нуклеотидные последовательности, которые анализировались с помощью программы MEGA (v.3.1) (Kumar, 2004; программа в свободном доступе на сайте http://www.megasoftware.net/) при использовании neighbour-joining-алгоритма с 1000 повторами (replications) bootstrap-теста.

Анализ дендрограмм показал, что исследованные изоляты *M. gallisepticum* отличаются по гену GapA от патогенного штамма «R». Изоляты формировали отдельную генетическую группу, близкую к слобопатогенному штамму «S6».

Таким образом, результаты сравнительной оценки патогенности полевых изолятов штамма «R» *M. gallisepticum* для цыплят посредством оценки цилиарной активности эпителия трахей сопоставимы с результатами, полученными методом секвенирования.

Выводы

Подобраны оптимальные условия для проведения опытов по изучению иммунобиологических свойств полевых изолятов *M. gallisepticum* в трахеальных органных культурах.

Наличие сопоставимых результатов при параллельном титровании микоплазм на твердых питательных средах и в трахеальных органных культурах свидетельствует о высокой чувствительности ТОК к *M. gallisepticum,* что позволяет использовать этот метод для количественного определения микоплазм как при работе с производственными, адаптированными к культивированию на питательных средах, так и при исследовании патогенных полевых изолятов микоплазм.

Результаты экспериментов по заражению культурами *M. gallisepticum* восприимчивых животных, коррелирующие с данными секвенирования, показали выраженную патогенность штамма «R» для цыплят по сравнению с исследованными изолятами.

Работа выполнена в рамках проекта с МНТЦ № 3017.

РЕЗЮМЕ

Показана возможность применения трахеальных органных культур для изучения иммунобиологических свойств микоплазм. Исследования по определению титра патогенных изолятов микоплазм, проведенные с использованием трахеальных органных культур, и оценка их концентрации в колониеобразующих единицах, показали сопоставимые результаты. Результаты сравнительной оценки патогенности для цыплят полевых изолятов и штамма «R» *Mycoplasma gallisepticum* по цилиарной активности эпителия трахей подтверждались результатами, полученными методом секвенирования.

SUMMARY

The opportunity of using tracheal organ cultures for studying immunobiological properties of mycoplasma is demonstrated in the paper. Optimal conditions for studies were selected. The conducted studies aimed at the determination of the titer of pathogenic isolates of mycoplasma using tracheal organ cultures and evaluation of their concentration in the colony-forming units showed comparable results. The results of comparative evaluation of pathogenicity of field isolates and of strain «R» *M. gallisepticum* for chicks by determination of ciliary activity of trachea epithelium are comparable with the results obtained by sequencing.

Литература

1. Подбор условий для выделения полевых изолятов возбудителей микоплазмозов птиц от больных птиц и из проб патологического материала / И.А, Рунина, М.И. Сорокина, М.Ю. Волков [и др.] // 2-й Междунар. вет. конгр. по птицеводству. М., 2006. С. 89-92.
2. Методические указания по приготовлению и поддержанию трахеальной органной культуры куриных эмбрионов и цыплят / О.А. Чупина [и др.] Владимир, 2004.
3. Bearson, S.M. Induction of a Mycoplasma gallisepticum pMGA gene in the chicken tracheal ring organ culture model / S.M. Bearson, S.D. Collier, B.L. Bearson // Avian Dis. 2003. Vol. 3. P. 745-749.
4. Cassell, G. H. Mycoplasmas respiratory infections / G.H. Cassell, W.A. Clyde, J.K. Davis // The Mycoplasmas. Mycoplasma Pathogenicity. Inc. Orlando, Acad. Press, 1985. Vol. 4. P. 69–106.
5. Feberwee, A. An experimental model to quantify horizontal transmission of Mycoplasma gallisepticum / A. Feberwee, D.R. Mekkes, D. Klinkenberg // Avian Pathol. 2005. Vol. 3. P. 355-361.
6. Papazisi, L. Analysis of cytadherence-deficient, GapA negative Mycoplasma gallisepticum strain R / L. Papazisi, K.E. Troy, T.S. Gorton // Infect. Immun. 2000. Vol. 68, №12. P. 6643-6649.

УДК 619:579.843.93:616-078

С.С. Сыбатуллов, О.В. Прунтова, О.И. Ручнова, С.А. Хрульнова
(ФГУП ГосНИИгенетика, г. Москва)

ПОЛУЧЕНИЕ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ *ORNITOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* В СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Введение

На протяжении последних 20 лет большое внимание зарубежные исследователи уделяют изучению бактерий *O. rhinotracheale*. В настоящее время считается доказанным, что *O. rhinotracheale* являются причиной острой контагиозной болезни, поражающей респираторные органы домашних птиц (аэросаккулит, ринотрахеит, пневмония, плеврит и др.). Смертность у цыплят-бройлеров при этой болезни может достигать 20%. У индеек в возрасте 12 недель и старше данная инфекция может вызывать острую пневмонию со смертностью, доходящей до 50% [1]. Степень выбраковки при убое пораженного стада цыплят–бройлеров может достигать 90%.

Длительность болезни, клиническая признаки, смертность при вспышках орнитобактериоза варьируют в зависимости от факторов окружающей среды: высокая плотность посадки птицы, повышенная концентрация аммиака в воздухе, недостаточная вентиляция, сопутствующие болезни [2, 3].

Бактерии *O. rhinotracheale* широко распространенны в странах с промышленно развитым птицеводством [2].

Изоляты *O. rhinotracheale* трудно дифферинцировать по биохимическим признакам от бактерий семейства *Pasteurellaceae*.

Для идентификации изолятов *O. rhinotracheale* широко применяют реакцию иммунодиффузии в агаровом геле, при помощи её было выделено 7 серотипов *O. rhinotracheale* (A, B, C, D, E, F, G), реакцию агглютинации, реакцию преципитации в агаровом геле и иммуноферментный анализ (ИФА) [4]. Для ИФА используют антигены *O. rhinotracheale*, инактивированные формальдегидом, экстрагированные кипячением и др. [3, 4].

В настоящее время в РФ отсутствует серологическая диагностика *O. rhinotracheale*.

Целью нашей работы было получение специфических компонентов *O. rhinotracheale* для использования в РА и ИФА, и оценка их активности и специфичности.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. В работе использовали бактерии *O. rhinotracheale* штамм К33 из музея ФГУ «ВНИИЗЖ», *Salmonella enteritidis* штамм №7, *Mycoplasma gallisepticum* штамм «S6», полученные из музея ФГУ «ВГНКИ»; *Pasteurella multocida* штамм №11039 серовариант А1,полученный из Американской коллекции типовых культур (АТСС).